

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16437

研究課題名（和文）活性化NK細胞を用いた新たなCAR-NK細胞療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new CAR-NK cell therapy using activated NK cells

研究代表者

神谷 尚宏（KAMIYA, TAKAHIRO）

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・特任助教

研究者番号：20574693

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、NK細胞を用いたCAR-NK療法の開発・改良を通して、固形腫瘍など現在のCAR-T細胞療法における限界を乗り越え新たな領域を開発することを目標とした。まずNK細胞増殖を安定的に得られる系として、NK刺激因子であるIL-15と41BBLを細胞表面に強制発現させたK562細胞株の作成に成功、単細胞培養の後に発現の強い細胞株を樹立した。次に新たなNK細胞用CARコンストラクトをデザインしクローニングを行った。また、評価系としてフローサイトメトリーを用いた細胞障害活性アッセイや脱顆粒・細胞内サイトカインアッセイを確立した。一方、安定した活性化NK細胞培養やCAR発現を得るに至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回得られたNK細胞活性化細胞株や、免疫細胞の活性化を評価する指標としての細胞障害活性、サイトカイン産生能、脱顆粒能の測定系の確率は、CAR細胞療法に限らず様々な免疫細胞療法の研究に応用できる重要な成果であると考えられる。

また、安定した発現を得るに至らなかったものの、新たなCARコンストラクトの最適化により今後NK細胞を用いたCAR研究が広がるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to overcome the limitations of the current CAR-T cell therapy such as the one for solid tumors, by developing and improving a new CAR therapy with NK cells. First, as a system to obtain stable NK cell proliferation, we succeeded in creating a K562 cell line with forced expression of NK stimulating factors IL-15 and 41BBL on the cell surface. The cell line was purified with strong expression after single cell culture. Next, a new CAR construct for NK cells was designed and cloned. We also established cytotoxic activity assays using flow cytometry, and degranulation and intracellular cytokine assays as evaluation systems. On the other hand, stable activated NK cell culture and CAR expression could not be achieved.

研究分野：免疫細胞療法

キーワード：CAR NK細胞 免疫細胞療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗 CD19CAR-T 細胞は、既存の治療法では治癒が全く望めなかった再発・難治の CD19 陽性白血病・リンパ腫症例に対して画期的な抗腫瘍効果を発揮し、治療法を根本から変える大きな発見となった。しかし CD19 陰性腫瘍の再発や、他のがん種への応用など開発の余地が大きく残されていた。NK 細胞は自然免疫細胞として、がん細胞や感染細胞などを排除する機能を有しており、その抗腫瘍効果は多くの基礎・臨床研究で示されている。しかしその非特異性や細胞増殖が困難であることなどから、免疫細胞療法としての活性化 NK 細胞療法は未だ確立されていない。

NK 細胞を用いた CAR 免疫細胞療法が確立された場合、現在の CAR-T 療法および NK 細胞療法双方の限界を克服できる可能性があり、NK 細胞専用の CAR コンストラクトを作成し、新たな CAR-NK 細胞療法を確立することの意義が大きいと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はサイトカイン刺激を組み込んだ NK 細胞専用の新たな CAR コンストラクトを作成し、現行の CAR-T 細胞療法の問題点を解決することとした。

具体的には NK 細胞を CAR に用いるために解決すべき問題として、生体外および生体内で十分に増殖し、長期間にわたりその活性を維持できることの 2 点が挙げられ、これを解決するため NK-CAR 細胞のための新規コンストラクトの作成 作成した CAR コンストラクトの発現・機能について細胞株およびヒト末梢血単核球由来 NK 細胞を用いて検証 マウスモデルにおいて新規 CAR-NK 細胞の抗腫瘍活性、増殖能の確認までを目的として計画した。

### 3. 研究の方法

NK-CAR 細胞のための新規コンストラクトの作成では T 細胞用の細胞内シグナル伝達ドメインを、NK 細胞用に上記サイトカインのレセプターシグナル伝達ドメインへ置き換え、もしくは細胞膜表面にサイトカインが共発現するように CAR とサイトカインを共発現させる方法を検討。各コンストラクトは核酸合成もしくは PCR を用いたクローニングにより作成し、レンチもしくはレトロウイルスベクターに挿入、大腸菌に導入し増幅・精製・確認を行う。

作成した CAR コンストラクトの発現・機能について細胞株およびヒト末梢血単核球由来 NK 細胞を用いて検証では 作成した CAR コンストラクトをト末梢血単核球由来 NK 細胞もしくは NK 細胞株 (NK92 細胞) に導入し、その細胞表面発現をフローサイトメトリーにて、シグナル伝達についてサイトカイン分泌、フローサイトメトリー、ウエスタンブロッティングなどを用いて確認することを計画した。末梢血単核球由来の活性化 NK 細胞は IL2 添加下に末梢血単核球と IL15 および 41BBL を発現した K562 細胞を共培養し作成、活性化した NK 細胞に上記ウイルスベクターを用いて CAR 遺伝子導入する計画とした。

上記実験により最も良い機能を示した CAR コンストラクトを選定し、その CAR-NK 細胞を用い、腫瘍細胞株を NSG マウスに投与した Xenograft モデルにおいて in Vivo における抗腫瘍活性、増殖能を確認することとした。

### 4. 研究成果

NK 細胞を刺激するサイトカインシグナル伝達部位を組み込んだ CAR-コンストラクトを構造解析ソフトによりシグナル伝達ドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインとバランスよく配置することを確認しデザイン、クローニングを行った。

NK 細胞刺激のための細胞株として、膜付着 IL-15 および 41BBL をそれぞれクローニングし白血病細胞株である K562 細胞にレトロウイルスベクターを用いて導入した。遺伝子導入した細胞株はシングルセル培養によりシングルセル由来のクローンとして単離され、フローサイトメトリーによってその発現を確認し、シグナルの強いものを選択し凍結保存した。(Figure.1)

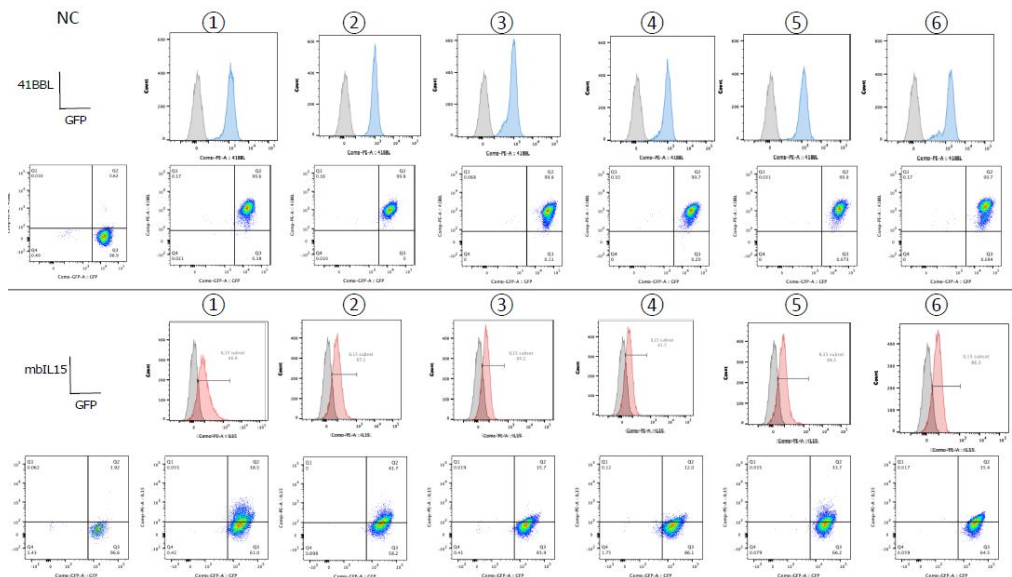


Figure.1 膜附着 IL-15 および 41BBL を遺伝子導入された K562 細胞の蛋白発現解析

また、免疫細胞の細胞障害活性を測定する系として、放射線同位体を使用せず Calcein-AM で染色した細胞をフローサイトメトリーで測定する細胞傷害活性アッセイを確立した (Figure.2)。

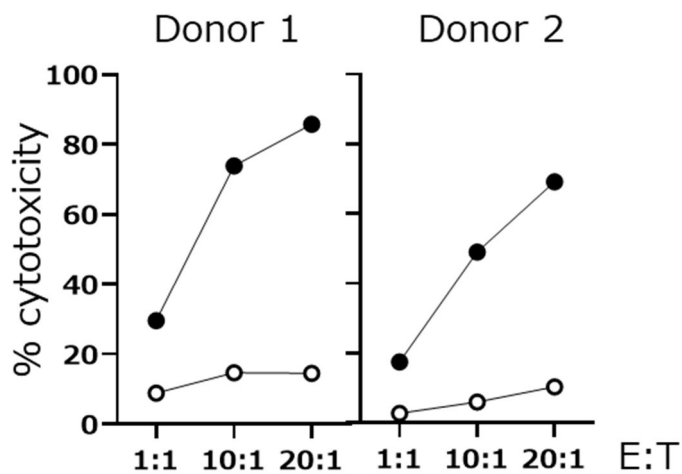


Figure.2 活性化 T 細胞を用いた細胞傷害活性の最適化

確立した K562 細胞株を用いて、活性化 NK 細胞を用いた細胞活性の評価や遺伝子導入を行う予定であったが、安定した細胞増幅を得ることが出来ず、で作成した CAR コンストラクトの遺伝子導入まで至らず、マウスを用いた実験も開始することが出来なかった。

NK 細胞培養条件の最適化や NK 細胞への遺伝子導入の改良が課題であり、克服する必要がある課題として残った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takahiro Kamiya
2. 発表標題 NK cell immunotherapy for childhood cancer: its ' potential advantages and barriers to overcome
3. 学会等名 The 12th JSH International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------